

DER TOPOCHEMISCHE NACHWEIS WASSERLÖSLICHER KOHLENHYDRATE
IM FILTERPAPIERVERSUCH DURCH DIE
 AgNO_3 -AZETON, Ba(OH)_2 -METHANOL REAKTION

von

INGRID PUSCH

1965.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554419_0008

Aus dem Anatomischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr.Dr. A.Dabelow

DER TOPOCHEMISCHE NACHWEIS WASSERLÖSLICHER KOHLENHYDRATE

IM FILTERPAPIERVERSUCH DURCH DIE

AgNO_3 -AZETON, Ba(OH)_2 -METHANOL-REAKTION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

INGRID PUSCH

aus Radeberg

MAINZ 1965

Dekan: Professor Dr. Korting
Referent: Professor Dr. Müller
Korreferent: Professor Dr. Dr. Dabelfow
Tag der mündl. Prüfung:

Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst Mainz

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Für den histotopochemischen Nachweis wasserlöslicher Kohlenhydrate stehen nach der bisher vorliegenden Literatur nur wenige brauchbare Methoden zur Verfügung. Während der Nachweis von Eiweißkörpern, Polysacchariden und Lipiden geringe Schwierigkeiten bereitet, ist es kaum möglich, die wasserlöslichen Kohlenhydrate im histologischen Schnittpräparat zu erfassen. Dies gilt im besonderen Maße für die Monosaccharide, deren Bedeutung für den Gesamtstoffwechsel des tierischen und menschlichen Körpers hier nicht näher hervorgehoben zu werden braucht.

Die erschwerte topochemische Reaktion kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden:

1. Die Löslichkeit der Zucker bezieht sich nicht nur auf Wasser, sondern auch auf andere Fixierungs- und Lösungsmittel. Bei der Fixierung eines Gewebestückes werden die Zucker, die nicht an Eiweiß gebunden sind, in das Fixierungsmittel aufgenommen und damit aus dem Gewebe herausgelöst.
2. Reaktionen, die auch kleinste Mengen der Kohlenhydrate nachweisen, ohne das untersuchte Gewebe zu zerstören, sind kaum bekannt.

Als Bedingung für einen histologischen Zuckernachweis müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Der Nachweis muß topochemisch, also ohne Dislokation erfolgen.
2. Das Gewebe muß mit allen seinen histologischen Strukturen erhalten bleiben.
3. Die Reaktion muß auch kleinste Mengen erfassen und sich auf einzelne Kohlenhydrate oder Stoffgruppen bestimmter Konfiguration beziehen lassen.

Welche Reaktionen für einen topochemischen Nachweis geeignet erscheinen, läßt der Filterpapierversuch erkennen. Hierbei können reine Lösungen in bestimmter Konzentration und Flüssigkeitsmenge aufgetropft werden, auf die dann die entsprechenden Reagentien einwirken können. Derartige Versuche sind von MÜLLER (1962) mit der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA durchgeführt worden.

Es konnte dabei nachgewiesen werden, daß sich Glucose bis zu einer Konzentration von 0,0025% exakt topochemisch am Filterpapier erfassen läßt. Das bedeutet, daß, auf die Dimensionen einer Zelle übertragen, selbst

Spuren von Glucose zu bestimmen sind. Da sich aber auch andere Mono- und Disaccharide (MÜLLER, 1964) im Filterpapierversuch positiv verhalten, liegt hier keine spezifische Reaktion vor. Es werden damit alle Kohlenhydrate erfaßt, die am 1.Kohlenstoffatom eine reduzierende Aldehydgruppe und am 3.Kohlenstoffatom eine freie Hydroxylgruppe tragen. Es handelt sich also um eine Gruppenreaktion.

Ein Zucker von besonderer Bedeutung, die 3-O-Methylglucose, ist von dieser Reaktion ausgeschlossen, da die Hydroxylgruppe am 3.Kohlenstoffatom durch eine Methylgruppe blockiert ist. Die 3-O-Methylglucose wird während der Passage durch den Körper fast nicht metabolisiert, verhält sich aber sonst wie Glucose (CSAKY und WILSON, 1956). Sie ist daher für die Erforschung des Stoffwechsels von größter Wichtigkeit.

Bei der Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA werden die Zucker durch eine $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -gesättigte Methylalkohollösung gefällt. Reagenzglasversuche (MÜLLER, 1964) ergaben, daß die Einwirkung bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt erfolgen muß, wenn es nicht zur Zerstörung des Kohlenhydratmoleküls kommen soll. Die Einwirkung von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -gesättigtem Methylalkohol auf tierisches Gewebe führt nicht nur einen Niederschlag der Kohlenhydrate herbei, sondern der Methylalkohol fixiert gleichzeitig die Zellen und Gewebe. Bringt man im Kryostaten hergestellte Gewebsschnitte in die Lösung, so ist dieser Schnitt einem Filterpapierstreifen vergleichbar, dem zahlreiche Kohlenhydrate zusammen aufgetropft sind, oder der in ein Gemisch solcher Kohlenhydrate getaucht wurde. Wird der Kryostatschnitt bei tiefer Temperatur getrocknet, kann es praktisch zu keiner Dislokation in den Zellen und den anderen Gewebsbestandteilen kommen. Das vorhandene Wasser wird aus der festen sofort in die gasförmige Phase übergeführt und die Kohlenhydrate bilden in amorpher Form im getrockneten Schnitt einen Niederschlag. Damit sind die gleichen Voraussetzungen wie für eine Reaktion am getrockneten Filterpapierstreifen gegeben.

Auf die Möglichkeit, nach diesem Prinzip auch radioaktive Zucker autoradiographisch nachzuweisen, kann hier nur kurz verwiesen werden (MÜLLER, 1964).

Da die Reaktion nach OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA für den Nachweis von 3-O-Methylglucose nicht geeignet war, wurde von MÜLLER (1964) eine Methode entwickelt, mit der im Filterpapierversuch auch dieser Zucker exakt zu erfassen war. Danach läßt man zuerst eine AgNO_3 -Azeton-Lösung einwirken und behandelt mit einer $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Methanol-Lösung nach. Zucker, die

eine oder mehrere freie reduzierende Gruppen tragen, reagieren in Form einer Schwärzung der betroffenen Filterpapierstelle.

Die beschriebene Reaktion ist ähnlich der in der Papierchromatographie angewandten Reaktion nach TREVELYAN et al. (1950).

Diese AgNO_3 - NaOH -Methode wird in folgender Weise durchgeführt: Trockene Chromatogramme werden 3-4 Minuten in eine Silbernitrat-Azeton-Lösung getaucht und anschließend mit einer 0,5 n-Lösung von Natriumhydroxyd in Äthylalkohol besprüht. Reduzierende Zucker werden an der braunen oder schwarzen Reaktionsstelle erkannt. Allerdings werden so auch andere Substanzen, wie die Polyalkohole, nachgewiesen, sie reagieren jedoch langsamer. Denn die ammoniakalische Silbernitratlösung wird ebenfalls unerklärlicherweise von Polyalkoholen reduziert. HOUGH (1950) führt Manitol, Sorbitol, Glycerol und Ethylene Glycol an. Das Vorhandensein dieses Effektes wird von HOUGH als "a most surprising and unpredictable result" bezeichnet.

Am histologischen Schnitt ist die Anwendung der Originalmethode von TREVELYAN, PROCTER und HARRISON (1950) nicht möglich, da mit stark wässrigen Reaktionslösungen gearbeitet wird.

Die von TREVELYAN und seinen Mitarbeitern gebrauchte Silbernitrat-Azeton-Lösung wird durch Mischen von 0,1 ml einer gesättigten wässrigen AgNO_3 -Lösung mit 20 ml Azeton hergestellt. Zu diesem Gemisch wird nun tropfenweise Wasser hinzugefügt, bis alles ausgefallene Silbernitrat gelöst ist. Die alkoholische 0,5 n NaOH -Lösung erhält man, indem man gesättigte wässrige NaOH -Lösung in Äthanol auflöst. Bei HOUGH (1962) handelt es sich um eine 40%ige wässrige Lösung von Natriumhydroxyd in Äthanol.

MÜLLER (1964) hat festgestellt, daß Silbernitrat in wasserfreiem Azeton etwas gelöst werden kann. Dies wird durch Schütteln von AgNO_3 -Kristallen in Azeton erzielt. Außerdem wurde anstelle der alkoholischen NaOH -Lösung eine Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung verwendet. Dieses Gemisch ergab gegenüber den bisher gebrauchten verschiedene Vorteile.

So zeichnet es sich durch einen geringen Wassergehalt aus, wobei aber die für den Reaktionsausfall notwendigen Hydroxyl-Gruppen vorhanden sind. Gleichzeitig wird damit eine Fällung verschiedener Zucker erreicht. Im übrigen kann die erforderliche Gewebefixation sowohl durch Azeton als auch durch Methanol herbeigeführt werden. Läßt man jetzt die Reaktion am gefriergetrockneten Material oder am trockenen Filterpapier ablaufen, so ist eine Verlagerung der wasserlöslichen Zucker nicht möglich, sie reagieren an Ort und Stelle.

Aber auch mit dieser AgNO_3 -Azeton-Methode lassen sich bestimmte wasserlösliche Kohlenhydrate, insbesondere Zucker, nicht spezifisch nachweisen. Eine positive Reaktion ergeben alle Substanzen, die eine reduzierende Aldehyd- oder Ketogruppe tragen. Auch hierbei handelt es sich also um eine Gruppenreaktion.

Es ergibt sich natürlich die Frage, ob eine solche Methode trotzdem geeignet ist, eine bestimmte Substanz im Gewebe sichtbar zu erfassen. Ein derartiger Nachweis wäre dann möglich, wenn dem lebenden Organismus eine positiv reagierende Substanz zugeführt wird, die während der Aufnahme in den Körper oder im Körper selbst nicht metabolisiert wird. Vergleicht man dann die Reaktionen zwischen einem behandelten und einem unbehandelten Organ, so ist eine verstärkte Reaktion der zugeführten Substanz, also z.B. einem bestimmten Zucker zuzuschreiben. Eine ganz spezifische Reaktion kann man natürlich mit radioaktiven Zuckern im Autoradiogramm erhalten. Auf diesem Wege ist der zugeführte Zucker leicht von anderen Substanzen mit positiver AgNO_2 -Azeton-Reaktion abzutrennen. Allerdings sind der autoradiographischen Technik Grenzen gesetzt, die vor allem in der Korngröße zu suchen sind. Vielleicht können hier mit der in letzter Zeit entwickelten elektronenmikroskopischen Autoradiographie neue Wege gefunden werden.

Der zur Reaktionsprüfung wichtige Vergleich zwischen einem behandelten und einem unbehandelten Organ kann am Darm eines Tieres erfolgen. Dazu braucht nur ein bestimmtes Kohlenhydrat in eine abgebundene Darmschlinge des lebenden Tieres eingespritzt zu werden, wonach dann dieser Darmanschnitt mit einem unbehandelten Darmstück verglichen wird. Über entsprechende Versuche ist von MÜLLER (1955, 1964, 1964) berichtet worden.

Da, wie festgestellt, sowohl reduzierende Kohlenhydrate als auch Alkohole positiv mit der AgNO_3 -Azeton-Methode reagieren, ist eine Untersuchung über einen möglichen Unterschied im Ablauf der Reaktionen von Interesse.

Für die hier vorliegende Arbeit sollten dabei folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluß hat die Reaktionsdauer auf den Ausfall der Reaktion?
2. Welchen Einfluß hat die Temperatur auf die Reaktion?
3. Welchen Einfluß hat die Konzentration der AgNO_3 bzw. Ba(OH)_2 -Lösung?

TECHNIK

Folgende Lösungen verschiedener Kohlenhydrate, bzw. von Zuckern und Polyalkoholen wurden für die Untersuchungen verwendet:

1. Formol
2. Glucose
3. 3-O-Methylglucose
4. 3-O-Äthylglucose
5. Glucose-1-Phosphat
6. Galactose
7. Fructose
8. Fructose-1,6-Diphosphat
9. Mannose
10. Mannit
11. Sorbose
12. Sorbit
13. Rohrzucker
14. Lactose
15. Arabinose
16. Xylose
17. Xylit
18. Äthylenglykol
19. Glycerin

Die in Aqua bidest. gelösten Substanzen wurden mit einer Pipette auf Whatman-Papier Nr.1 aufgetropft. Die Tropfen enthielten $0,01 \text{ cm}^3$ der Lösungen. Sie verteilten sich im Filterpapier auf eine Fläche von ca. 1 cm Durchmesser.

Die Konzentration der Lösungen betrug für den Hauptversuch 0,1%, so daß in jedem Tropfen 10 Gamma der Testsubstanz enthalten waren. Es wurden aber auch Konzentrationen von 1% bis 0,001% geprüft. Zur Kontrolle wurde Aqua bidest., also das reine Lösungsmittel aufgetropft. Nach dem Auftropfen wurde das Filterpapier luftgetrocknet.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

Versuch I

Zur Untersuchung kamen Filterpapierstreifen mit den aufgetropften Testlösungen von Glucose, 3-0-Methylglucose, Sorbit und Mannit in verschiedenen Konzentrationen.

Die Einwirkungsdauer der Silbernitrat-Azeton-Lösung betrug jeweils 100 Sekunden; die der Bariumhydroxyd-Methanol-Lösung betrug 10, 20, 100 Sekunden und 5, 10, 60 Minuten.

Die Temperaturen der Reaktionslösungen waren:

AgNO ₃ -Azeton	Ba(OH) ₂ -Methanol
a. Zimmertemperatur	Zimmertemperatur
b. Zimmertemperatur	0° C
c. Zimmertemperatur	-25° C
d. -25° C	-25° C

Versuch II

Untersucht wurden betropfte Filterpapierstreifen mit Testlösungen verschiedener Konzentrationen wie in Versuch I, aber mit unterschiedlich hergestellten AgNO₃-Azeton- und Ba(OH)₂-Methanol-Lösungen. Die Reaktion wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Einwirkungsdauer der Silbernitrat-Azeton-Lösung betrug 100 Sekunden, die der Bariumhydroxyd-Methanol-Lösung ebenfalls.

Die Reaktionslösungen wurden folgendermaßen hergestellt:

1. 2 g AgNO₃ wurden in 100 cm³ Azeton pro Analyse 10 Minuten geschüttelt.
2. 0,2 g AgNO₃ in 100 cm³ Azeton p.A. schütteln.
3. 0,02 g AgNO₃ in 100 cm³ Azeton p.A. schütteln.
4. 5 g Ba(OH)₂ wurden in 100 cm³ Methanol pro Analyse 10 Minuten geschüttelt, anschließend gefiltert und das Filtrat für die Reaktion benutzt.
5. 0,5 g Ba(OH)₂ in 100 cm³ Methanol p.A.
6. 0,05 g Ba(OH)₂ in 100 cm³ Methanol p.A.

Versuch III (Hauptversuch)

Die Reaktionslösungen wurden wie im Versuch II_{1,4} hergestellt, also 2 g AgNO₃ in Azeton und 5 g Ba(OH)₂ in Methanol geschüttelt.

Die Testsubstanzen (mit Nr. 20 Aqua bidest.) wurden in einer Konzentration von 0,1 g% angesetzt, die Tropfengröße betrug 0,01 ml.

Die Einwirkungsdauer der Reaktionslösungen betrug für die AgNO₃-Azeton- und für die Ba(OH)₂-Methanol-Lösung

10, 20, 100 Sekunden und 5, 10, 60 Minuten.

Die Temperatur der Reaktionslösungen war:

	AgNO_3 -Azeton	Ba(OH)_2 -Methanol
1.	-25°C	-25°C
2.	Zimmertemperatur	-25°C
3.	0°C	0°C
4.	Zimmertemperatur	0°C
5.	-25°C	Zimmertemperatur
6.	0°C	Zimmertemperatur
7.	Zimmertemperatur	Zimmertemperatur

Die Reaktion wurde zusammengefaßt wie folgt durchgeführt:

1. Auftropfen der Lösungen auf Whatmanpapier Nr.1.
2. Lufttrocknung der Filterpapiere.
3. Einlegen der Filterpapiere in AgNO_3 -Azeton-Lösung (bei verschiedenen Temperaturen der Lösung). Nach 10, 20, 100 Sekunden oder 5, 10, 60 Minuten Einlegen der Papiere in
4. Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung (bei verschiedenen Temperaturen der Lösung) für 10, 20, 100 Sekunden oder 5, 10, 60 Minuten.
5. Fixieren in 1% iger Na-Thiosulfatlösung für 10 Minuten.
6. 30 Minuten Wässern der Filterpapierstreifen.
7. Trocknen der Filterpapiere.
8. Aufkleben der Papiere auf Karton nach dem abgebildeten Schema.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE UND BESPRECHUNG DER BEFUNDE

1. Einfluß der Konzentration der Reaktionslösungen auf den Ausfall der Reaktion

Wie aus der Abbildung I zu ersehen ist, ist die Stärke des Reaktionsausfalles beinahe ausschließlich von der Konzentration der Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung abhängig. Ist diese zu schwach, so ist auch bei einer hochkonzentrierten AgNO_3 -Azeton-Lösung kaum eine Reaktion zu erkennen.

Hinzugefügt werden muß allerdings, daß die angegebenen Mengen des Silbernitrats und Bariumhydroxyds nicht den wirklich gelösten Mengen entsprechen. Bei den großen Quantitäten bleibt auch nach langem Schütteln der Lösungen stets ein Teil der Salze ungelöst am Boden der Gefäße zurück.

2. Einfluß der Konzentration der Testlösungen auf den Reaktionsausfall

Die Reaktion muß selbstverständlich von der Konzentration der Testlösungen abhängen. Die Abbildung II zeigt, daß ein Unterschied des Reaktionsausfalles bei hohen Konzentrationen überhaupt nicht oder kaum merkbar ist. Die 1%-igen Lösungen reagieren gleich stark wie 0,1%ige. Bei einer Konzentration von 0,01% reagieren die 3-O-Methylglucose deutlich schwächer, Glucose, Sorbit und Mannit etwas stärker, aber alle doch erheblich schwächer als die 0,1%igen Lösungen.

Die Testlösungen von 0,001%iger Konzentration sind kaum noch zu erfassen. Ein Tropfen enthält $0,01 \text{ cm}^3$ Flüssigkeit. Nach dem Auftropfen verteilt er sich in dem Filterpapier über eine Fläche von etwa 1 cm Durchmesser. Folgende Substanzmengen sind in einer Tropffläche enthalten:

bei	1%	100 Gamma Substanz
	0,1%	10 Gamma Substanz
	0,01%	1 Gamma Substanz
	0,001%	0,1 Gamma Substanz

Damit ist bewiesen, daß diese Reaktion etwa gleich empfindlich ist wie entsprechende, in der Papierchromatographie verwandte KH-Reaktionen.

3. Einfluß der Reaktionszeit und Temperatur der Reaktionslösungen

Um den Reaktionsausfall bei verschiedener Reaktionszeit und Temperatur anschaulich graphisch darzustellen, wurden die verschiedenen Papiere bei gleicher Temperatur, aber unterschiedlich langer Einwirkungsdauer der AgNO_3 -Azeton-Lösung oder der Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung nach dem folgenden Schema (Abbildung III) aufgeklebt und anschließend fotografiert.

Für die einzelnen Testsubstanzen konnten nun die positiven Reaktionen (siehe Abbildung IV und V) für jede Temperatur der AgNO_3 -Azeton- und Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung und jede Reaktionszeit in das entsprechende Schema eingetragen werden. Die schwache Reaktion wurde durch einen Punkt, die stark positive Reaktion (Schwärzung der Filterpapierstelle) als schwarzes Quadrat dargestellt. Aus der Abbildung V ist zu ersehen, daß der Reaktionsausfall vom Zeitfaktor abhängt.

1. Je länger die Testfilterpapierstreifen in der Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung liegen, um so stärker ist die Reaktion.

Schema der aufgetropften Lösungen und der verschiedenen Konzentrationen in %

Ba(OH)₂ - Methanol

	5 gr in 100 cm ³	0,5 gr in 100 cm ³	0,05 gr in 100 cm ³
2 gr in 100 cm ³			
0,2 gr in 100 cm ³			
0,02 gr in 100 cm ³			

AgNO₃ - Azeton

Reaktion bei Zimmertemperatur
AgNO₃ - Azeton 100 sek
Ba(OH)₂ - Methanol 100 sek

Glucose ↓	3-0-Methyl- Glucose ↓	Sorbit ↓	Mannit ↓
1,0			
0,1			
0,01			
0,001			

Abb. I

Ba (OH)₂ - Methanol

Temperatur der Lösungen

						AgNO ₃ - Azeton	Ba (OH) ₂ - Methanol
10 Sek	20 Sek	100 Sek	5 Min	10 Min	60 Min	Zimmer- temperatur	Zimmer- temperatur
100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	Zimmer- temperatur	0°C
100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	Zimmer- temperatur	- 25 °C
100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	100 Sek	- 25 °C	- 25 °C

AgNO₃ - Azeton

Abb. II

Schema der aufgetropften Lösungen und der verschiedenen Konzentrationen in %

Glucose	3-0- Methyl- Glucose	Lactose	Mannit
↓ 1,0	↓	↓	↓
0,1			
0,01			
0,001			

zu Abb. II

Schema der verschiedenen aufgetropften Lösungen

Formol		Aqua dest
Glucose	3-0 Methylgl.	3-0 Methylgl.
Glucose 1-phos.	Galactose	Glycerin
Fructose	Rohr- zucker	Äthylenglykol
Fructose 1,6-Diphos.	Sorbose	Sorbit
Arabinose	Mannose	Mannit
Lactose	Xylose	Xylit

Abb. III

Erklärung zu Abbildung IV :

Die Reaktionszeit für AgNO_3 beträgt jeweils
100 Sekunden.

Die Reaktionszeit für Ba(OH)_2 beträgt
10 , 20 , 100 Sekunden und
5 , 10 , 60 Minuten.

Temperatur der Lösungen

		Temperatur der Lösungen							
		AgNO ₃	-25°	+20°	0°	+20°	-25°	0°	+20°
		Ba(OH) ₂	-25°	-25°	0°	0°	+20°	+20°	+20°
1	Aqua dest:								
2	Formol								
3	Glucose								
4	3-0 Methyl-glucose								
5	3-0 Äthyl-glucose								
6	Glucose-1-Phosphat								
7	Galactose								
8	Fructose								
9	Fructose-1,6-Diphosphat								
10	Mannose								
11	Mannit								
12	Sorbose								
13	Sorbit								
14	Rohrzucker								
15	Lactose								
16	Arabinose								
17	Xylose								
18	Xylit								
19	Äthylenglykol								
20	Glycerin								

Abb. IV

Schema der verschiedenen Reaktionszeiten

$\text{Ba}(\text{OH})_2$ - Methanol

	10 sek	20 sek	100 sek	5 min	10 min	60 min
10 sek						
20 sek						
100 sek						
5 min						
10 min						
60 min						

zu Abb. $\bar{\text{V}}$

Temperatur der Lösungen

		Temperatur der Lösungen						
		AgNO ₃		Ba(OH) ₂				
		- 25°	+ 20°	0°	+ 20°	- 25°	0°	+ 20°
		- 25°	- 25°	0°	0°	+ 20°	+ 20°	+ 20°
1	Aqua dest.							
2	Formol							
3	Glucose							
4	3-0 Methyl-glucose							
5	3-0 Äthyl-glucose							
6	Glucose - 1-Phosphat							
7	Galactose							
8	Fructose							
9	Fructose - 1,6-Diphosphat							
10	Mannose							
11	Mannit							
12	Sorbose							
13	Sorbit							
14	Rohrzucker							
15	Lactose							
16	Arabinose							
17	Xylose							
18	Xylit							
19	Äthylen-glykol							
20	Glycerin							

Abb. V

2. Das längere Verbleiben der Teststreifen in der AgNO_3 -Azeton-Lösung ist für den Ausfall der Reaktion nicht im gleichen Maße entscheidend.
3. Bei langen Reaktionszeiten reagieren auch die mit Aqua bidest. zur Kontrolle betropften Filterpapierstellen.

Am Beispiel der positiv reagierenden Aqua bidest.-Tropfen läßt sich der Einfluß der Temperaturen sehr leicht demonstrieren (siehe Abbildungen IV und V). Eine generell positive Reaktion erhält man, wenn die Temperatur der $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Methanol-Lösung über 0°C liegt.

Das gleiche Verhalten von Glucose-1-Phosphat, Fructose-1,6-Diphosphat, Rohrzucker, Lactose und Äthylenglycol weist darauf hin, daß die positive Reaktion nur vorgetäuscht und auf das Lösungsmittel Aqua bidest. zurückzuführen ist.

Dasselbe ergibt sich auch aus der Abbildung IV, welche die Versuche bei konstanter AgNO_3 -Azeton-Einwirkungsdauer und verschiedenen langer $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Methanol-Einwirkung demonstriert. Auch hier reagieren die genannten Substanzen nicht, da sich die Reaktion wie bei Aqua bidest. verhält.

Daß es überhaupt zu einer Reaktion des Aqua bidest. kommen kann, läßt sich mit in ihm oder im Filterpapier enthaltenen Verunreinigungen erklären. Von den Herstellern des verwendeten Whatman-Papieres wird das Vorhandensein von beweglichen und unbeweglichen Verunreinigungen im Papier bestätigt und erläutert. Wenn man in dem Filterpapier, ohne daß ihm eine Substanz hinzugefügt wurde, mit Wasser oder Säure ein zweidimensionales Chromatogramm laufen läßt, so erhält man an den Ecken des Papieres eine Ansammlung seiner Nichtzellulosebestandteile. Ferner erklären sie, daß die Asche des qualitativen Papieres Whatman Nr.1 aus vier Hauptgruppen besteht:

1. Kalziumsalze
2. Natriumsalze
3. Silikate und Kieselsäure
4. Mg, Fe, Al, Cu, Pb und Spuren anderer Elemente.

Da Zellulose Ammoniak aufnimmt, wird außerdem empfohlen, das Papier in einer ammoniakfreien Atmosphäre aufzubewahren; es auszuwaschen oder in einem geschlossenen Gefäß über einem Kationenaustauscherharz aufzubewahren.

Tatsächlich ist diese positive Reaktion des Aqua bidest. nicht vorhanden, wenn die Einwirkungsdauer des $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Methanols nicht zu lange ist und die Temperatur dieser Lösung niedrig gehalten wird.

4. Vergleich des Reaktionsausfalls verschiedener Testsubstanzen

Reduzierende Substanzen wie Formol, Glucose usw. reagieren sehr stark. Zucker, bei denen die am dritten Kohlenstoffatom vorhandene OH-Gruppe blockiert ist, die 3-0-Methylglucose und die 3-0-Äthylglucose, reagieren etwas schwächer als Glucose. Noch schwächer ist die Reaktion der Mannose. Eine Tatsache, die sich nicht erklären läßt, da Mannose auch Fehlingsche Lösung reduziert. Ihr Reaktionsausfall entspricht etwa dem des Glycerins.

Aus den Abbildungen IV und V ist außerdem zu entnehmen, daß Polyalkohole wie Mannit, Sorbit, Xylit ebenfalls positiv reagieren. Lediglich das Xylit reagiert bei tiefer Temperatur schwächer als das entsprechende Aldehyd.

Demnach ist eine Trennung der Aldehyde von den Polyalkoholen mit veränderten Reaktionstemperaturen nicht möglich.

5. Kurze Bemerkung zum Reaktionsmechanismus

Die Erklärung der Reaktion wäre sehr einfach, wenn nur Aldehyde positiv reagieren würden. Sie entspräche dann der ammoniakalischen Silbernitratreaktion. In Gegenwart der OH-Ionen der Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung reduziert die Aldehydgruppe das AgNO_3 bis zum elementaren Silber.

Die Frage, warum es auch zur Reduktion bei der Anwesenheit von Polyalkoholen kommt, läßt sich im Rahmen dieser Untersuchung nur hypothetisch beantworten. Wahrscheinlich kommt es unter dem Einfluß der stark alkalischen Ba(OH)_2 -Methanol-Lösung primär zur Degradation der Polyalkohole und damit schließlich zur Bildung von Aldehyden oder Formaldehyd, die dann sekundär die Reduktion der AgNO_3 -Lösung herbeiführen. Die nach VAN EKEN-STEIN benannte Reaktion läuft bekanntlich in ähnlicher Weise ab und erklärt auch die positive Reaktion der Fructose.

6. Kann die Reaktion eine Bedeutung für den histotopochemischen Nachweis der Kohlenhydrate haben?

Es besteht wohl kein Zweifel, daß aus allen vorgezeigten Versuchen zu entnehmen ist, daß mit dieser AgNO_3 -Azeton- Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion ein spezifischer Nachweis von Kohlenhydraten nicht möglich ist. Besonders, da die Reaktion auch bestimmte Polyalkohole erfaßt.

Die Versuche zeigen aber, daß ein Nachweis kleinster Kohlenhydratmengen

topochemisch durchgeführt werden kann. Bei Zufuhr eines bestimmten Kohlenhydrates z.B. in den Darm sind daher beim Vergleich histologischer Schnitte eines unbehandelten und eines behandelten Darmstückes Rückschlüsse auf die Aufnahme des Kohlenhydrates in die Darmwand möglich.

Die Versuche bestätigen erneut die Möglichkeit, kleinste Mengen bestimmter Kohlenhydrate ohne Verlagerung mit dieser Reaktion zu fixieren.

Bei Anwendung der autoradiographischen Technik könnte man dann auch eine spezifische Trennung vornehmen, wenn nämlich radioaktive nicht oder kaum metabolisierende Kohlenhydrate untersucht werden können (MÜLLER, 1964).

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Filterpapier aufgetropfte Testlösungen (Zucker und Polyalkohole) werden mit einer AgNO_3 -Azeton-, Ba(OH)_2 -Methanol-Reaktion geprüft.

Es wird untersucht, welchen Einfluß die Reaktionszeit, die Temperatur der Lösungen und ihre Konzentration auf den Ausfall der Reaktion haben. Es wird ferner geprüft, ob eine Trennung der positiv reagierenden reduzierenden Testsubstanzen von Alkoholen, die ebenfalls positiv reagieren, möglich ist.

Die Untersuchungen ergeben:

1. Temperatur und Konzentration der Lösungen und die Reaktionszeit beeinflussen den Reaktionsausfall.
2. Eine exakte Trennung von reduzierenden Testsubstanzen und Polyalkoholen ist bei Veränderung der Temperatur der Lösungen und verschiedenen Reaktionszeiten nicht möglich.
3. Kohlenhydrate werden mit dieser Reaktion nicht spezifisch nachgewiesen. Sie sind aber fixiert und damit bei Verwendung radioaktiver reiner Testsubstanzen spezifisch zu erfassen.

LITERATURVERZEICHNIS

- HAIS, J. M. Handbuch der Papierchromatographie.
MACEK, K. Bd. I, Grundlagen und Technik, 272-274 (1958)
- HOUGH, L. Application of Paper Partition Chromatography to the
Separation of the Polyhydric Alcohols.
Nature, Vol. 165, 400 (1950)
- MÜLLER, G. Die Fixierung von Glucose und 3-Methylglucose an Fil-
terpapier und ihr Nachweis durch die Reaktion nach
OKAMOTO, KADOTA und AOYAMA (1948).
Acta histochem. Bd. 14, 270-275 (1962)
- MÜLLER, G. Histotopochemische Untersuchung der Xylitresorption im
Rattendarm.
Klin. Wochenschr. 42. Jahrg., 9. Heft, 454-456 (1964)
- MÜLLER, G. Über den autoradiographischen Nachweis von C^{14} -Galac-
tose und H^3 -3-0-Methyl-Glucose im Rattendarm.
Acta histochem. Bd. 19, 97-103 (1964)
- TREVELYAN, W. E. Detection of Sugars on Paper Chromatograms.
PROCTER, D. P. Nature, Vol. 166, 444 (1950)
- HARRISON, J. S.
- WHISTLER, R. L. Methods in Carbohydrate Chemistry.
WOLFROM, M. L. Vol. I, Analysis and Preparation of Sugars,
21-31 (1962)
- WHATMAN Chromatographie.
Werbeschrift

LEBENS LAUF

Am 18. Oktober 1936 wurde ich, Ingrid Pusch, als Tochter des Zahnarztes Gottfried Pusch und seiner Ehefrau Charlotte in Radeberg in Sachsen geboren. 1942 wurde ich eingeschult. Nach acht Grundschuljahren besuchte ich die Oberschule in Radeberg und legte 1954 das Abitur ab. Im gleichen Jahre immatrikulierte ich mich zum Studium der Zahnheilkunde an der Friedrich-Schiller-Universität zu Jena. Dort legte ich in den Jahren 1955, 1956 und 1957 das Vorphysikum, das Humanmedizinische und das Zahnmedizinische Physikum ab. Nach letzterem verließ ich Jena und setzte mein Studium im November 1957 an der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz fort, wo ich es im November 1960 mit dem Staatsexamen beendete. Anschließend arbeitete ich bis zum März 1963 als Assistentin in einer zahnärztlichen Praxis in der Schweiz und bin seither an der Zahnklinik des Krankenkassenverbandes in Aachen beschäftigt.

